



Y1HGold 单杂筛库试剂盒 使用说明书

产品编号: YH1000-1T

产品组成

组成	产品	产品货号	产品名称	规格
成份一 常温储存	培养基	PM2011	YPDA Medium	0.5L×1
		PM2272	SD/-Ura with Agar	0.5L×2
		PM2271	SD/-Ura Broth	0.5L×1
		PM2202	SD/-Leu with Agar	0.5L×10
		PM2201	SD/-Leu Broth	0.5L×1
成份二 -20℃储存	筛选剂	CA2332G	金担子素 A (AbA, 1mg/mL)	1mL
	鉴定试剂盒	SK2422	酵母基因组菌落 PCR 试剂盒	20T
		SK2420	酵母阳性克隆快速检测试剂盒	200T
	转化试剂盒	SK2402	Super 酵母感受态制备与转化试剂盒 Plus	200T
	质粒	VT001	pGADT7 质粒	10µg
VT009		pAbAi 质粒	10µg	
成份三 -80℃储存	对照菌株	YS3081	Y1HGold[p53-AbAi]菌株 (备用)	0.2mL
		YS3082	Y1HGold[p53-AbAi+pGADT7-p53]菌株	0.2mL
		YS3083	Y1HGold[p53-AbAi+pGADT7]菌株	0.2mL
	感受态细胞	CC308	Y1HGold 感受态细胞	20×100µL/支

注:

1. 本试剂盒可用于一次诱饵筛库实验 (质粒除外), 如需要单独采购某个组分, 请联系本公司。
2. 注意每个成份的保存温度, 感受态细胞务必-80 °C保存。
3. 规格 0.5L×2 表示: 2 个包装, 每个包装 0.5L; 规格 5×1mL 表示: 1 个包装, 含 5 个 1mL。
4. 对照菌株的最佳 AbA 浓度参考网站菌株说明书。

产品说明:

Y1HGold-GAL4-AbA 酵母单杂系统使用的菌株 Y1HGold 是 MAT α 型, 可直接转化质粒进行筛库试验。

筛选标记为: *ura3*, *leu2*; 报告基因为: *AbAr*。

Y1HGold-GAL4-AbA 酵母单杂系统需要 pAbAi 和 pGADT7 两种质粒配套使用。质粒 pAbAi 的筛选标志为 URA, 用于表达 pBait-AbAi construct (1~3 个 bait DNA 序列重复串联后克隆到 pAbAi 中); 质粒 pGADT7 的筛选标志为 LEU, 用于表达 AD(GAL4 C 端 768~881 位氨基酸)与目标蛋白(Prey)的融合蛋白。GAL4-AbA 酵母单杂系统原理: Aureobasidin A (AbA)是一种环酯肽抗生素, 在低浓度(0.1-0.2 µg/mL)下即可对酵母产生毒性。基因组中整合了 pBait-AbAi 的酵母菌株 (Bait-Reporter Yeast Strains), 当猎物蛋白 (Prey) 结合到诱饵序列 (Bait DNA) 上, GAL4 AD 就会激活 *AbAr* 的表达, 从而能够在含有抗生素 AbA 的培养基上生长。*AbAr* 与营养缺陷报告基因相比具有更低背景的优点, 可以降低酵母单杂假阳性发生的概率。

本公司根据多年经验, 结合本公司的单杂培养基套装、感受态制备和酵母基因组菌落 PCR 等试剂盒,



对筛库的操作流程进行了优化。本方案在 pBait-AbAi 和文库质粒载体构建已完成的基础上进行撰写，分为三个步骤：构建诱饵酵母菌株，筛选诱饵菌株的 AbA 最佳使用浓度，制备 Y1HGold[pBait-AbAi]感受态与筛选 cDNA 文库，本方法还对阳性克隆的确认与互作进行了分析，即单杂互作验证。

目录

一、实验耗材和试剂	2
二、菌株使用与保存	3
三、实验方法	3
3.1 构建诱饵酵母菌株 (pBait-AbAi 转化 Y1HGold)	3
3.1.1 pBait-AbAi 质粒线性化	3
3.1.2 pBait-AbAi 转化 Y1HGold	4
3.1.3 诱饵菌株鉴定	4
3.2 筛选诱饵酵母菌株的 AbA 最佳使用浓度	5
3.3 制备 Y1HGold[pBait-AbAi]感受态与筛选 cDNA 文库	5
四、阳性克隆的确定与互作分析	6
4.1 筛选阳性克隆	6
4.2 互作克隆鉴定	7
4.2.1 文库质粒回转验证	7
4.2.2 转录因子全长重新构建 pGADT7 载体回转验证	8
五、注意事项	8

一、实验耗材和试剂

本试剂盒提供的产品以**产品组成**为准，部分试剂和耗材需要自备，也可以在本公司单独购买。

1. 灭菌的枪头 (1000 μ L、200 μ L、10 μ L)、涂布棒或玻璃珠， Φ 90 mm 或 Φ 150 mm 培养皿，备用。
2. Carrier DNA 在 95-100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min，后快速冰浴，可再重复一次，备用。
- 3 稀释金担子素：取 100 μ L AbA (1 mg/mL) 于 900 μ L 无水乙醇中稀释，充分混匀，即 AbA 浓度为 100 μ g/mL，4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用 (稀释 10 倍后使用，有利于在培养基中混匀，建议按用量稀释)。
4. 自备 0.9% 生理盐水，可用 ddH₂O 无菌水代替，备用。
5. 普通平板制备

将 1 条培养基溶于 0.5 L 去离子水中，无需调节 pH 值，高压灭菌 (如，115 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min)。液体培养基 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存；固体培养基，20-25 mL/块倒平板 (Φ 90 mm) 或 70-75 mL/块倒平板 (Φ 150 mm)，凝固后 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

6. 特殊平板制备

SD/-Leu (AbA) 或 SD/-Ura (AbA)：将一条 SD/-Leu with Agar 培养基溶于 500 mL 去离子水中，无需调节



pH 值，高压灭菌（如，115 °C 灭菌 20 min），冷却至 50 °C 左右，参照表 1 加入稀释后的金担子素（AbA），倒平板 20 mL/块（Φ90 mm），凝固后于 4 °C 冰箱保存。

表 1. 不同 AbA 浓度的平板

培养基体积 (mL)	20	20	20	20	20	20	20
AbA(100 µg/mL)加入量 (µL)	0	20	40	60	100	140	200
AbA 终浓度 (ng/mL)	0	100	200	300	500	700	1000

二、菌株使用与保存

- 挑取一环甘油保存的菌液（10-50 µL）于 SD 平板上划线，28-30 °C 培养 3-5 d，培养出来的单菌落可直接用于互作验证实验。
- 挑取上述单菌落于 SD 液体培养基中，200 r/min、28-30 °C 振荡培养 2 d，OD₆₀₀ 应大于 1，取 1 mL 菌液集菌，弃上清，加入 0.2 mL 15% 甘油，-80 °C 可长期保存。

注： Y1HGold[p53-AbAi+pGADT7-p53]和 Y1HGold[p53-AbAi+pGADT7]用 SD/-Leu 培养基，

Y1HGold[p53-AbAi]用 SD/-Ura 培养基。

三、实验方法

3.1 构建诱饵酵母菌株（pBait-AbAi 转化 Y1HGold）

3.1.1 pBait-AbAi 质粒线性化

pBait-AbAi、p53-AbAi 和 Empty pAbAi 空载（或 Mutant Bait pAbAi）测序后，将其大肠杆菌菌液进行扩大培养，然后提取质粒。用 BstB I 限制性内切酶（NEB）进行线性化处理。

诱饵载体酶切体系

组分	体积
BstB I	4-10µL
质粒 DNA	4-10µg
10×Buffer	20-50µL
无酶 ddH ₂ O	补充至 200-500µL

65 °C 酶切 2 h，0.8% 的琼脂糖跑胶，检测载体是否酶切完全，纯化回收。要求回收后质粒浓度 > 100 ng/µL。

注： Empty pAbAi 空载（或 Mutant Bait pAbAi）线性化后转入 Y1HGold，作为可选对照组。



3.1.2 pBait-AbAi 转化 Y1HGold

1 取 100 μL 冰上融化的 Y1HGold 感受态细胞 (货号: CC308), 依次加入预冷的线性化质粒 5 μL (2-5 μg), Carrier DNA 10 μL (95-100 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 快速冰浴, 重复一次), PEG/LiAc 500 μL 并吸打几次混匀, 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。

2 将管放 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。

3 5000 rpm 离心 40 s 弃上清, ddH₂O 400 μL 重悬, 离心 30 s 弃上清。

4 ddH₂O 50 μL 重悬, 涂板 SD-/Ura 平板, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3-5 d。

注: 同时将 Y1HGold 阳阴性菌株于 SD 平板划线活化。

3.1.3 诱饵菌株鉴定

1. 准备 PCR 预混液: 根据检测克隆数, 等比例扩大配制体积。

试剂	50 μL 反应体系
高保真 PCR Mix	44 μL
Y1H 引物混合物 (或其它上下游引物)	1 μL (各 0.5 μL)

2. 吸取 5 μL 酵母快速裂解液加入 PCR 管中。

3. 用无菌牙签或 10 μL 枪头刮取筛选出来 SD/-Ura 固体培养基上的单菌落 (直径 1-2 mm, 刮取 1/4 即可) 悬浮在裂解液中。

4. 吹打或者震荡混匀后使用 PCR 仪 98 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 5 min, 即为裂解产物。

5. 在裂解产物中加入 45 μL PCR 预混液 (含引物), PCR 扩增。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min (15-30 s/kb); 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。35 个循环。

6 将 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳并测序验证。

注:

a. 本公司提供的酵母基因组菌落 PCR 试剂盒中 Y1H 引物混合物 (未公开序列) 扩增空载 pAbAi 重组 Y1HGold 的产物为 1346 bp。测序可以用 pAbAiF (GCTCCTTCCTTCGTTCTTCCTTC), 或插入片段的特异性引物。

b. 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增产物, 鉴定阳性克隆, 消除假阳性 (PCR 分析结果应为: 阳性对照. 1.4 kb; 阴性对照. 无条带; 诱饵菌株. 1.35 kb+insert size)。



3.2 筛选诱饵酵母菌株的 AbA 最佳使用浓度

诱饵酵母菌株在没有 Prey 载体存在情况下,其基本 AbA 表达量非常低。对于不同的诱饵片段,其 AbA* 最佳使用浓度不同。因此,需要筛选每个诱饵酵母菌株的 AbA 最佳使用浓度,具体步骤如下。

1. 上述的转化验证成功之后,每个样品挑取新鲜单菌落(2-3 mm)于 1 mL 0.9%氯化钠溶液中重悬,OD600 调至 0.002 (也可以用 SD/-Ura 液体培养基培养至 OD600=0.002)。
2. 取 100 μ L 菌液分别涂布到含不同 AbA 浓度的 SD/-Ura 平板上,30°C 培养 2-3 d。
3. 观察诱饵酵母在不同 AbA 浓度平板上生长状况,从而确定 AbA 最佳使用浓度。

注: 在不同浓度 AbA 平板上(0, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 300 ng/mL, 500 ng/mL, 700 ng/mL, 1000 ng/mL), 出现的酵母菌斑最少或完全没有,即为 AbA 最佳使用浓度(最佳抑菌浓度、最小抑菌浓度、本底表达浓度、自激活浓度)。一般情况下筛库自激活 AbA 浓度不宜超过 800 ng/mL。

3.3 制备 Y1HGold[pBait-AbAi]感受态与筛选 cDNA 文库

酵母菌株 Y1HGold 含有 Leu2-3 基因,在生理状态下该基因处于抑制状态,不能合成亮氨酸,所以诱饵酵母菌株不能在缺亮氨酸的培养基(SD/-Leu)上生长。文库 cDNA 载体 pGADT7 含有 LEU2 基因,当文库质粒成功转入诱饵酵母菌株时,诱饵酵母能够在缺亮氨酸的培养基(SD/-Leu)上生长。当文库中的猎物蛋白与诱饵片段互动时,激活诱饵酵母中的 AbA 抗性基因(AUR1-C),从而互作的酵母菌株能够在 SD/-Leu/AbA*培养基上健康生长。

1. 挑取鉴定成功的 Y1HGold[pBait-AbAi]单菌落接种到含有 3 mL YPDA 液体培养基的 15 mL 摇菌管中。30°C, 200 rpm 过夜培养。
2. 将 3 mL 小摇菌体(上步小摇所得)接到含有 50 mL 液体 YPDA 培养基的三角瓶中继续培养,待 OD600 达到 0.4-0.5, 3000 rpm 离心 5 min, 弃上清。(4°C 保存 1 周内的酵母菌液,用 3 mL 接种 50 mL YPDA 培养基过夜培养亦可)。
3. 用 10 mL Y1 溶液重悬沉淀, 3000 rpm 离心 5 min, 弃上清。
4. 加入 600-1000 μ L Y2 溶液重悬,转文库按 600 μ L 分装,转质粒按 100 μ L 分装,可直接用于转化或冷冻保存。

注: 制备好的感受态细胞需缓慢冷冻后,再置于-80°C冰箱长期保存。将感受态细胞放入程序降温盒,或用多层纸包裹放入泡沫盒中,先置于-80°C冰箱过夜后,再取出感受态置于-80°C冰箱,可保存一年。使用前室温融化后用于转化。



5. 取上述 Y1HGold[pBait-AbAi]感受态细胞 600 μL 于冰上，依次加入预冷的 15-25 μg cDNA 文库质粒（约 30 μL ）、2520 μL Y3 溶液，轻柔吸打混匀，30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 90 min（每隔 10 min 翻转 6-8 次混匀）。对于部分菌种，延长孵育时间可提高转化效率，但不要超过 3 小时。

注：文库质粒加入量与文库质量有关，可根据实际情况加入。建议用 ddH₂O 补充体积，将质粒与 Y3 溶液的体积定容为 2.6 mL。

6. （可选步骤）3000 rpm 离心 5 min，弃上清。用 3 mL YPD Plus Liquid Medium 重悬沉淀，30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床震荡培养 90 min。

7. 3000 rpm 离心 5 min，弃上清。加入 15 mL 0.9%氯化钠溶液重悬菌体，涂筛选培养基平板。

注：上述为酵母大规模转化，将文库质粒转化进诱饵酵母菌株中；同时做小规模转化将 pGADT7 和 pGADT7-53 转化 Y1HGold[p53-AbAi]作为阴、阳对照，涂布在 SD/-Leu。本试剂盒已包含阳性对照菌，在相应的培养基上划线培养即可。

8. 取上一步的 50 μL 重悬菌体，按 1/10、1/100、1/1000 比例稀释，各取 100 μL 菌液于 SD/-Leu、SD/-Leu/AbA* 两种平板（ Φ 90 mm）涂布；

9. 剩余重悬菌体，每 150 μL 涂布于 SD/-Leu/AbA*平板（ Φ 150 mm）；

注：总共 15 mL，每板 150 μL 可涂布 100 块。每板可以适当增加重悬菌体量，减少平板数量，建议 35-100 块平板（ Φ 150 mm）。与自激活浓度相比，筛库平板 AbA*浓度应高出 50 ng/mL。

10. 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3-5 d，统计 SD/-Leu (Φ 90 mm)平板上单菌落数目，计算文库筛选克隆数。

文库筛选克隆数= [cfu/mL on SD/-Leu] \times [稀释倍数] \times [重悬体积(15 mL)]

转化效率=克隆细胞数 \times 悬浮体积 (mL) \times 稀释倍数 \times [涂板子体积 (mL) \times 总 DNA 的量 (μg)]⁻¹

注：SD/-Leu 平板上，至少要有 1.0×10^6 个克隆，如果克隆数较少，会降低筛选到阳性克隆的概率。

SD/-Leu/AbA*平板上，非常少克隆数往往与诱饵序列和文库质量有关。有研究表明 30 万个克隆也能筛选到阳性克隆。

四、阳性克隆的确定与互作分析

4.1 筛选阳性克隆

1. 复筛活化菌株

（可选步骤）将筛选得到的单菌落于 SD/-Leu/AbA*平板划线，2-4 d 能够生长的菌落再用于后续验证。

注：此步骤选做，与下面的 3.复筛鉴定互作酵母菌株有重复。



2. 菌落 PCR 鉴定互作酵母菌株

选择直径约为 2~3 mm 的克隆，菌落 PCR 扩增，引物为 pGADT7-F/R，PCR 体系和程序参见酵母阳性克隆快速检测试剂盒（货号：SK2420）。

3. 复筛鉴定互作酵母菌株

电泳条带大于 400 bp（根据实验目的和实际情况而定）的单菌落，划线于 SD/-Leu/AbA*培养基上，30 °C 培养 2-4 d。有多条电泳条带的单菌落（含有多个质粒的转化子），需要在 SD/-Leu/AbA*筛选培养基上重复划线培养 2-3 代，然后通过菌落 PCR 的方法选出具有单个质粒的克隆。

4.2 互作克隆鉴定

互作克隆鉴定也称点对点互作验证或回转验证。在回转验证实验中，AD 载体有两种形式，文库质粒或互作基因 CDS 片段重新构建 pGADT7 质粒，都可以用于验证实验。可以参考本公司的 Y1HGOLD 单杂互作验证试剂盒，这里仅做简要描述。

将上述 PCR 产物送公司测序，使用 BLAST 序列比对工具在线分析阳性克隆的测序结果，根据测序和序列比对结果，将与数据库中转录因子同源性高的阳性克隆的文库质粒，提取质粒后重新转化 Y1HGOLD[pBait-AbAi]菌株。或通过 NCBI 在线 Blast 分析转录因子 CDS，然后根据其对应的引物，以 cDNA 为模板（建库时的 cDNA），扩增转录因子全长，重新构建 pGADT7 载体，并转化 Y1HGOLD[pBait-AbAi]菌株。

4.2.1 文库质粒回转验证

1. 用 SD/-Leu 液体培养基摇阳性酵母克隆菌株，离心收集菌体并提取文库质粒。如果阳性克隆超过 60 个，方法参见 96 孔一步法酵母质粒小提试剂盒（货号：PE056）；如果阳性克隆少于 60 个，方法参见一步法酵母质粒小提试剂盒（货号：PE055）。
2. 从酵母中提取的文库质粒转入 E.coli 感受态细胞，转化液全部涂布在含 Amp 的 LB 培养基上，37°C 培养 16 h。每个样品取 3-5 个克隆（重复）进行菌液 PCR 鉴定。
3. 挑取鉴定成功的单菌落摇菌，提取大肠杆菌中的文库质粒，方法参见**公司的质粒小提试剂盒说明书。
4. 提取的文库质粒转入 Y1HGOLD[pBait-AbAi]为实验组。pGADT7 空载体转入 Y1HGOLD[pBait-AbAi]对照组，可以更好的体现实验组是否互作。文库质粒转入 Y1HGOLD[Mutant Bait pAbAi]，可以避免诱饵序列突变（或无诱饵）的情况下，猎物直接激活报告基因而造成的假阳性，这种假阳性并不多见，可以省略如表 2 表 3。



5. 文库质粒转化诱饵菌株，快速离心转化液，0.9%的氯化钠溶液分别悬浮转化菌体，涂布 SD/-Leu 培养基上，30°C培养 3-5 d。

6. 取转化后的重组子菌落，重悬于 0.9%的氯化钠溶液中，将 OD600 调至 0.2、0.02、0.002、0.0002。分别取 100 μL 菌悬液涂布于 SD/-Leu/AbA*和 SD/-Leu 培养基上，30°C倒置培养 3-5 d，观察菌落生长情况，如表 2 表 3。

注：

上述为涂板法验证酵母杂交互作，梯度稀释点板法可参考本公司的 Y1HGold 单杂互作验证试剂盒。

7. 将转化后的重组子酵母进行 PCR、测序、比对分析（或提取质粒、PCR、测序、比对分析），方法同上。

4.2.2 转录因子全长重新构建 pGADT7 载体回转变验证

以 cDNA 为模板（建库时的 cDNA），扩增转录因子全长，重新构建 pGADT7 载体，并转化 Bait 菌株。方法同上，验证结果如表 2 表 3。

表 2. 阳性

Sample	Selective Agar Plate	Distinct 2 mm Colonies
Y1HGold[Bait/AbAi] +AD Prey	SD/-Leu	Yes
	SD/-Leu/AbA*	Yes
Y1HGold[Bait/AbAi] +AD	SD/-Leu	Yes
	SD/-Leu/AbA*	No (or very small)
Y1HGold[Mutant/AbAi] +AD Prey	SD/-Leu	Yes
	SD/-Leu/AbA*	No (or very small)

表 3. 假阳性

Sample	Selective Agar Plate	Distinct 2 mm Colonies
Y1HGold[Bait/AbAi] +AD Prey	SD/-Leu	Yes
	SD/-Leu/AbA*	Yes
Y1HGold[Mutant/AbAi] +AD Prey	SD/-Leu	Yes
	SD/-Leu/AbA*	Yes

五、注意事项

1. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗，食品及化妆品等用途。
2. 为了您的安全和健康，请穿好实验服并佩戴一次性手套和口罩操作。
3. 请注意无菌操作，避免微生物污染。
4. 此方案仅供参考，如有疑问请致电咨询 400-878-6800。